

METHOD FOR MEASURING ACTIVATED HUMAN PROTEIN C

Patent number: JP3200066
Publication date: 1991-09-02
Inventor: KYODA TAKAHIRO; MAKI KOJI; INOUE KUNIYO
Applicant: TOSOH CORP
Classification:
- **international:** G01N33/577
- **european:**
Application number: JP19890338105 19891228
Priority number(s): JP19890338105 19891228

[Report a data error here](#)**Abstract of JP3200066**

PURPOSE: To exactly and immunologically measure the human protein C in blood in a short period of time with a high sensitivity by utilizing the monoclonal antibody specific for activated human protein C and human protein C inhibitor, etc. **CONSTITUTION:** The monoclonal antibody immobilized to the solid phase which specifically recognizes the activated human protein C, a sample, the monoclonal antibody labeled to specifically recognize the human protein C inhibitor, and the monoclonal antibody labeled to specifically recognize human a1 anti-trypsin are brought into contact and the label of the liberated or immobilized labeled antibody is directly or indirectly detected to determine the product of immune reaction. A sandwich method is used for this immunoassay. Any known methods may be adopted without limitations for the process for producing the monoclonal antibodies, the method for immobilizing the solid phase of the activated human protein C antibody, the method for labeling the human protein C inhibitor antibody, etc.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩日本国特許庁(JP)

⑪特許出願公開

⑫公開特許公報(A) 平3-200066

⑬Int.CI.

G 01 N 33/577

識別記号 庁内整理番号
B 9015-2G

⑭公開 平成3年(1991)9月2日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑮発明の名称 活性化ヒトプロテインCの測定方法

⑯特 願 平1-338105

⑰出 願 平1(1989)12月28日

⑱発明者 京田 高裕 神奈川県藤沢市湘南台4丁目26番地の5 サンパレス湘南
306

⑲発明者 牧 浩司 神奈川県海老名市河原口2398番地

⑳発明者 井上 國世 神奈川県相模原市相模大野7丁目37番17-402号

㉑出願人 東ソー株式会社 山口県新南陽市大字富田4560番地

明細書

1. 発明の名称

活性化ヒトプロテインCの測定方法

2. 特許請求の範囲

試料中の活性化ヒトプロテインCを測定する方法において、

(a) 活性化ヒトプロテインCを特異的に認識する、固相に固定化されたモノクローナル抗体(1)、

・試料、

・ヒトプロテインCインヒビターを特異的に認識するところの標識されたまたは標識されていないモノクローナル抗体(2)

・および、ヒトα₁アンチトリプシンを特異的に認識するところの標識されたまたは標識されていないモノクローナル抗体(3)

を接触させ

(b) (a)で標識されていないモノクローナル抗体

(2), (3)を使用した場合には(a)で生じる免疫反応生成物、またはモノクローナル抗体(2)および(3)を特異的に認識する標識された抗体を接触させ、

(c) 遊離の又は固定化された標識化抗体の標識を、直接的または間接的に検出して免疫反応生成物を定量する

ことを特徴とする活性化ヒトプロテインCの測定方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、活性化ヒトプロテインCに特異的なモノクローナル抗体、ヒトプロテインCインヒビターに特異的なモノクローナル抗体および、ヒトα₁アンチトリプシンに特異的なモノクローナル抗体を利用した活性化ヒトプロテインCの測定方法に関するものである。

(従来の技術)

血液凝固の制御反応の重要なものとして、プロ

テアーゼによる凝固因子の分解反応がある。この反応の主たるものは、プロテインCによるものである。

プロテインCはC1a含有凝固因子（ビタミンK依存性因子）の一つであり、正常血液中では2本鎖の前駆体として存在する。プロテインCはトロンビンにより高分子鎖のアミノ末端から12個のアミノ酸が遮離して活性化プロテインCとなる。これが、凝固系のV₈因子とV₉因子を分解して失活させる。また、活性化プロテインCはプラスミノーゲンアクチベーターインヒビターの活性を抑制して線維の亢進を起こす作用もある。

ヒトプロテインCインヒビターは、血液凝固抑制因子の活性化プロテインCの生理的阻害因子の一つである。精製されたプロテインCインヒビターは、試験管内では、X₁因子、トロンビン、X₁因子、血漿カリクレイン、さらに線溶系プロテアーゼの組織プラスミノーゲンアクチベーターや尿由来プラスミノーゲンアクチベーター（ウロキナーゼ）を阻害する。しかし、通常プロテイ

ンCがほとんど活性化されない状態での血液凝固過程を試験管内で行うと、プロテインCインヒビター活性の低下はほとんど見られない。また、生体内でのプロテインCインヒビターの濃度の変動はプロテインC濃度の変動と良く一致することも知られている。これらのことより、プロテインCインヒビターは生体内ではプロテインCと最も良く反応するものと考えられる。

また、プロテインCに対する別のインヒビターとして、ヒトアンチトリプシンが作用することが報告されている（M. J. Heeb & J. H. Griffin, J. Biol. Chem., 263, 11613, (1988)）。

以上のことより、活性化プロテインCをそのインヒビターとの複合体として測定することにより、血液凝固阻止活性を検出することになる。また、前血栓状態とされる糖尿病や、DICの病態診断が可能になる。プロテインCの血中濃度は、健常人では約2~3.0g/lである。

その測定方法としては、プロテインCに対する

モノクローナル抗体を用いたELISAが現在行われているが、活性化されたプロテインCの測定としては厳格な意味で向いていない。

(発明が解決しようとする課題)

本発明の目的は、従来の方法よりも正確に、短時間に、高感度に活性化ヒトプロテインCを免疫学的に測定する方法を提供することにある。

(課題を解決するための手段)

本発明者は上記課題に関し脱意検討した結果、本発明に到達した。

すなわち本発明は、試料中の活性化ヒトプロテインCを測定する方法において、

- (a) 活性化ヒトプロテインCを特異的に認識する、固相に固定化されたモノクローナル抗体(1)、
- ・試料、
- ・ヒトプロテインCインヒビターを特異的に認識するところの標識されたまたは標識されていないモノクローナル抗体(2)
- ・および、ヒトα₁アンチトリプシンを特異

的に認識するところの標識されたまたは標識されていないモノクローナル抗体(3)

を接觸させ

- (b) (a)で標識されていないモノクローナル抗体(2)、(3)を使用した場合には(a)で生じる免疫反応生成物、またはモノクローナル抗体(2)および(3)を特異的に認識する標識された抗体を接觸させ、

(c) 遷離の又は固定化された標識化抗体の標識を、直接的または間接的に検出して免疫反応生成物を定量する

ことを特徴とする活性化ヒトプロテインCの測定方法である。

本発明のヒトプロテインCインヒビター測定法は、ヒトプロテインCに特異的なモノクローナル抗体、ヒトプロテインCインヒビターに特異的なモノクローナル抗体および、ヒトα₁アンチトリプシンに特異的なモノクローナル抗体を利用した血液中のヒトプロテインCの免疫学的測定法であり、以下その詳細について説明する。

本発明方法において、用いられるモノクローナル抗体は、既に自体公知である方法 (G.

Kohler & C. Milstein,

Nature, 256, 495, (1975) に準じて製造することができる。

以上のように、ヒトプロテインC、ヒトプロテインCインヒビター又はヒトα₁アンチトリプシンを特異的に認識する複数種のモノクローナル抗体を得た。それぞれの抗体の結合定数は、10⁷～10⁸M⁻¹の範囲内であった。これらのモノクローナル抗体を使って、ヒトプロテインCを定量的に測定できるサンドイッチ法による免疫学的測定方法が可能となった。

本発明方法に用いられる抗活性化ヒトプロテインC抗体を固相に固定化する方法は、公知の方法を採用でき、固相としては例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリカーボネート、セファロース粒子、ラテックス、アガロース、セルロース、ポリメタアクリレートなどが使用される。

標識物質は上記物質に何ら限定されるべきものではない。

測定に使用される試薬は、上記物質以外にも、基質、溶解剤、緩衝剤、洗浄剤、反応停止剤等の公知の試薬が用いられる。

試料、抗体の組み順序には特に限定はない。

最終的に生成した免疫反応生成物、すなわち固定化された標識抗体の標識又は過剰の抗体の標識を検出し、定量すればよい。

(作用)

活性化ヒトプロテインCは、試料中に共存するヒトプロテインCインヒビターまたはヒトα₁アンチトリプシンと複合体を形成している。従ってこの複合体を定量することで、活性化ヒトプロテインCを間接的に定量することができる。ヒトプロテインCインヒビターは、ヒトプロテインCへの結合力は強いが、例えば血中での存在量が少く、一方、ヒトα₁アンチトリプシンはヒトプロテインCへの結合力は弱いが、血中では多量に存在する。そこで、活性化ヒトプロテインC-ヒトプロ

テインCインヒビター複合体及び活性化ヒトプロテインC-ヒトα₁アンチトリプシン複合体の両方を測定することで、より厳密に活性化ヒトプロテインCを測定することができる。従って本発明方法では、この複合体を抗活性化ヒトプロテインC抗体及び抗ヒトプロテインCインヒビター抗体、又は抗活性化ヒトプロテインC抗体及び抗ヒトα₁アンチトリプシン抗体でサンドイッチし、測定するのである。

尚、試料中にヒトプロテインCインヒビターとヒトα₁アンチトリプシンが存在しない場合は、外部から添加して複合体を形成させてから本発明法により測定すべきである。しかし、試料がヒト血液であれば、両者ともその中に含まれているので、外部から添加する必要はなく、そういったことからも試料はヒト血液であることが好ましい。

(発明の効果)

以上の説明から明らかなように本発明によれば、(1) 血液中の活性化ヒトプロテインC濃度は、1～200ng/mlの範囲内で測定することができ

でき、

(2) 従来法に比べて極めて簡便な操作で短時間に、かつより厳密な意味での活性化ヒトプロテインCを感度よく多数の検体の測定が可能である。
(実施例)

以下に本発明の詳細な実施例を説明する。しかし、本発明はこれら実施例にのみに限定されるものではない。

(モノクローナル抗体の調製)

(A) 抗原感作動物細胞の調製

ヒトプロテインC、ヒトプロテインCインヒター、又はヒト α_1 アンチトリプシンを抗原としてB α 1b/cマウス(4)をそれぞれ免疫した。免疫は、マウスの腹腔にフロントの完全アジュバントと抗原100 μ g/匹とを乳化させた血液100 μ lを投与した。2週間後に追加免疫として抗原100 μ g/匹をフロントの不完全アジュバントと乳化させたものの100 μ lをマウス腹腔に投与した。1週間後最終免疫として抗原100 μ g/匹をリン酸緩衝生理食塩水

B-アザグアニン耐性株として、SP2/0-Ag14(以下SP2/0と省略する)を使用した。細胞融合を行う1週間前まで20 μ g/mlのB-アザグアニン、15%FCSを含むDMEMで培養し、その後細胞融合日まで15%FCSを含むDMEMを使用した。細胞融合直前に、SP2/0は無菌的にDMEMで1000rpmで10分間遠心洗浄を2回繰り返し調製した。

(C) 細胞融合

上記(A)項で調製した肺臍細胞と上記(B)項で調製した骨髄臍細胞を5:1の割合で混じて(1000rpm、10分)し細胞ベレットを集めめた。遠心チューブを傾くたまいで細胞ベレットを皿面にうすく広げた。その中に37℃で吸めでおいた50%PEG(MERK社製ポリエチレングリコール4000)を含むDMEM溶液0.5mlを遠心チューブを回しながら少しづつ滴下した。1分間ゆっくりと遠心チューブを回転させ混合した後、30秒に1mlの割合で遠心チューブを回転しながら37℃で加温しておいたD

(0.85%NaCl含有0.01%リン酸緩衝液、pH7.2:以下PBS)に溶解したもの100 μ lを遠心内に投与した。3日後この処置マウスの脾臍を摘出的取出した。15%子牛胎児血清(以下15%FCSと省略する)を含むDMEM10mlを注射器で吸い取り27ゲージの注射針をつけた。脾臍を氷冷しておいたディッシュに入れ、注射針で数か所穴を開けた。注射針を差し込み遠心し脾臍細胞をディッシュに流出させた。流出液をナイロンメッシュで通過し遠心チューブに入れ、1000rpmで10分間遠心分離して上澄を捨てた。細胞ベレット中の赤血球を0.15M塩化アンモニウム溶液(1mMエチレンジアミン4酢酸-2ナトリウム塩(以下EDTAと省略する)を含む0.01Mリン酸緩衝液、pH7.2)で溶血させ遠心分離し、さらに細胞ベレットをDMEMで2回同様に遠心洗浄して肺細胞とした。

(B) 骨髄臍細胞の調製

骨髄臍細胞としてはB α 1b/cマウス由来の

MEMを10回加えた。つぎにFCSを2mlゆっくりと入れ、1000rpm、10分間遠心した。細胞ベレットを15%FCSと1×10⁻⁴Mヒポキサンチン、4×10⁻⁷Mアミノブチリン、1.6×10⁻⁶Mチミジンを含むDMEM(以下HAT培地と省略する)で2回遠心洗浄(1000rpm、10分間)した。この培養液を96ウェルプレート(Falcon #3042)に5×10³細胞個/ウェルになるように200 μ lずつ分注した。3日ごとにHAT培地を100 μ l/ウェル交換した。3週間後からは、1×10⁻⁴Mヒポキサンチン、1.6×10⁻⁶Mチミジンと15%FCSを含むDMEM(以下HAT培地と省略する)を培地交換に用いた。

(D) ハイブリドーマの選択

96ウェルプレートに細胞コロニーが認められる10日前後から固相酵素免疫測定法を行い、培養上清に特異的抗体が存在するかどうか調べた。

96ウェルプレート平底(インターメッド社製)に、各抗原2 μ g/mlを50 μ l/ウェル分注

し、37°Cで1.5時間静置する。ウエルに残っている培液を除去し、PBSに0.04%ツイーン(tween)-20を含んだ培液(以下PBS-T)で3回洗浄した後、0.1%ウシ血清アルブミン(以下BSA)を溶解したPBS-T培液300μlを各ウエルに加えて、37°Cで1.5時間ブロッキング処理した。つぎに各ウエルに上記培養上清を100μlずつ分注し37°Cで1.5時間静置した。これらのウエルをPBS-T培液で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識ラビット抗マウスIgG抗体(ジャクソン社製)4000倍希釈を50μl/ウエルずつ分注し、37°Cで1.5時間静置した。PBS-T培液で3回洗浄したのち、基質液(1.2%2,2-アジノジー(3-エチルベンズチアゾリン硫酸)-ジアンモニウム塩(ABTS)及び0.01%過酸化水素(H₂O₂)を含有する0.1Mケン酸緩衝液(pH 5.1))を各ウエルに100μl添加した。30分間室温で放置し、200mMシュウ酸培液を100μlを加えて酵素反応

を停止させた。415nmでの吸光度を測定し、酵素活性が認められたウエルに特異的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが存在することがわかる。以上のようにして、抗体価の強い抗体産生ハイブリドーマを取得した。

(E) コンデショニングメデウムの調製

26ゲージの注射針をつけた注射器に10mlの冷凍しておいた0.34Mサッカロース培液を長い放った。B+1b/cマウス(♂)を脊椎脱臼させ、無菌的に腹腔内に上記培液を注入した。注入後5分以内に左側腹部に18ゲージの注射針をつけ水冷しておいた注射器にて腹腔内培液を回収した。水冷しておいた遠心チューブに上記回収液を流し込み、1000rpmで5分間遠心分離した。遠心後上清を廻収し、細胞ベレットに15%FCS-DMEMを加え攪拌しデッシュに入れた。37°C、5%炭酸ガス濃度、95%湿度で一晩培養した。培養上清を換め、0.22μmのメンブレンフィルターで滤過し、これをコンデショニングメデウムとした。

(F) クローニング

抗体産生を認めるハイブリドーマについて限界希釈法を用いて単一クローニングした。上記(E)項で作製したコンデショニングメデウムを1ml含むHAT培地20mlを用意した。クローニングしたいハイブリドーマ細胞を各ウエルに1個になるように上記培養液中に滴下し、200μl/ウエルずつ96ウエルプレート(Falcon 3042)に分注した。培養10日目前後から細胞コロニーが認められるウエルについて、上記(D)項に記載した固相酵素免疫測定法に準じて抗体産生ハイブリドーマを選択し、さらに再度クローニングを繰り返し単一ハイブリドーマを樹立した。最終的に27クローニングのハイブリドーマを確立した。

(G) 抗体の精製

B+1b/cマウス(♂)6~10週令の腹腔にブリストン(2, 6, 10, 14-チトラメチルベンタデカン)を0.5ml/匹投与した。2週間後上記(F)項で得られた各特異的抗体産生

ハイブリドーマ株をマウス腹腔内に各クローニングについて2×10⁶細胞個/匹移植した。10日目前後に生成した腹水を、18ゲージの注射針を腹腔に差し込み、1/20量の0.2M-EDTAをいれた遠心チューブに滴下させた。遠心チューブを4000rpmで10分間遠心し、上清を廻めた。採取した上清を50%硫酸アンモニウム沈殿分離法にしたがって粗精製し、0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS培液に透析後、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル通過をおこない精製した。メルカプトエタノール還元下での12%SDS-ポリアクリラミド電気泳動で1本の粗縞と1本の軽縞の2本のバンドになったことで抗体の純度を確認した。

(酵素標識法によるヒトプロテインCの測定)

(A) 抗ヒトプロテインC抗体の固定化

未處理マイクロタイターブレート(96ウエル・アンクブレート、インターメッド社製)の各ウエルに0.1M炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.6)に溶解した3μg/mlのマウス由来の

抗ヒトプロテインC抗体の溶液 $200\mu l$ を加えて、4℃一夜インキュベートした。次に、各ウエルの溶液を除去し、PBS-Tで3回洗浄した後、0.1%BSAを溶解したPBS-T溶液 $300\mu l$ を各ウエルに加えて、4℃でブロッキング処理しそのまま保存した。

(B) 西洋ワサビペルオキシダーゼ(以下HRP)標識抗体の調製：0.3M重炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.1)に溶解したHRP溶液($5\text{mg}/\text{ml}$)に1%1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンのエタノール溶液 0.1ml を加え、室温にて1時間反応させた。その溶液に0.06M過ヨウ素酸ナトリウム 1.0ml を添加し30分反応させた。未反応の過ヨウ素酸ナトリウムを0.16Mのエチレングリコール 1.0ml を加えて除去した後、0.01M炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.5)で透析した。次に、マウス由来抗ヒトプロテインCインヒビター・モノクローナル抗体 5mg を加えて5~6時間反応させた。水素化ホウ素ナトリウム 5mg を添加して4℃中で

した。それに、1.2%ABTS及び0.01%過酸化水素(H₂O₂)を含有する0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.1)から成る基質溶液を各ウエルに $200\mu l$ 添加し、室温で30分間酵素反応させた後、 200mM シュウ酸溶液を $100\mu l$ 加えて酵素反応を停止させた。上記マイクロタイタープレートを各ウエルについて、波長 415nm 、対照波長 492nm の蛍光強度を自動マイクロタイタープレートリーダー(東ソー株式会社製、MPR-A4、商品名)で測定した。結果を表1に示す。

一夜放置した。この後、未反応の水素化ホウ素ナトリウムを除去するため、0.85%塩化ナトリウムを含む 10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.1)に対して4℃で一夜懸濁しながら透析した。上記反応物をTSK-ゲルG-3000SW(東ソー株式会社製、商品名)を用いて高速液体クロマトグラフィーにて精製し、HRP標識抗体とした。同様にして、抗ヒトαアンチトリプシン抗体の標識抗体も同様に調製した。

(C) 血液中のヒトプロテインCの定量

本実施例中の(A)で記述した方法で作製したマイクロタイタープレートを室温にもどし、PBS-T溶液で洗浄した後、既知量の活性化ヒトプロテインC・インヒビター複合体を含む標準血液を各ウエルにそれぞれ $20\mu l$ 加えた。つぎに本実施例(B)で得た2つのHRP標識抗体をPBS-T溶液で希釈し、各ウエルに $100\mu l$ ずつ添加した。そのまま室温で3時間インキュベートした後、溶液を除去しPBS-T溶液で3回洗浄

表1

プロテインC ・インヒビター 複合体 (ng/ml)	吸光度
0.8	0.04
1.6	0.06
3.2	0.11
6.3	0.21
12.5	0.36
25	0.57
50	0.92
100	1.28
200	1.57

表1から明らかなように、試料中のヒトプロテインCは $1\sim200\text{ng}/\text{ml}$ の範囲で定量できることが確認された。

特許出願人 東ソー株式会社